

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07051100 A**

(43) Date of publication of application: **28.02.95**

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68**

(21) Application number: **05216843**

(22) Date of filing: **10.08.93**

(71) Applicant: **TAKARA SHUZO CO LTD**

(72) Inventor:  
**NAKAGAWA TOMOKO**  
**MUKAI HIROYUKI**  
**SHIMADA MASAMITSU**  
**FUJINO KIMIYA**  
**KATOU IKUNOSHIN**

**(54) METHOD FOR DETECTING BACTERIUM OF GENUS LACTOBACILLUS**

(57) Abstract:

PURPOSE: To rapidly carry out amplification and detection of nucleic acid of a bacterium which belongs to the genus *Lactobacillus* by catching bacteria of the genus *Lactobacillus* as pretreatment of PCR on a filter and cleaning the bacteria.

CONSTITUTION: Bacteria of the genus *Lactobacillus* are caught on a filter as a pretreatment of PCR using DNA of bacterium of the genus *Lactobacillus* in a liquid sample containing bacteria (e.g. *Lactobacillus hiochii* bacterium)

of the genus *Lactobacillus* as a template and the bacteria are cleaned. There, PCR inhibitor in the liquid sample is removed and amplification of the nucleic acid of the bacterium of the genus *Lactobacillus* is promoted.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-51100

(43)公開日 平成7年(1995)2月28日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号  
Z N A Z 9453-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 14 頁)

(21)出願番号 特願平5-216843

(22)出願日 平成5年(1993)8月10日

(71)出願人 591038141

實酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 中川 朋子

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造  
株式会社中央研究所内

(72)発明者 向井 博之

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造  
株式会社中央研究所内

(72)発明者 嶋田 雅光

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造  
株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ラクトバチルス属細菌の検出方法

(57)【要約】

【目的】 ラクトバチルス属細菌、特に火落菌の、従来法より更に迅速かつ高感度な検出方法を提供する。

【構成】 プライマーを用いてラクトバチルス属細菌の核酸を増幅することによって液体試料中の該細菌を検出する方法において、該液体試料をフィルターに通してラクトバチルス属細菌を捕獲した後に該細菌を洗浄する工程を含有するラクトバチルス属細菌の検出方法。該洗浄工程は、捕獲したラクトバチルス属細菌に付着している後工程の増幅方法の阻害物質を洗去するためのものであり、洗浄液としては滅菌水、緩衝液が例示される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 プライマーを用いてラクトバチルス属細菌の核酸を増幅することによって液体試料中のラクトバチルス属細菌を検出する方法において、該液体試料をフィルターに通してラクトバチルス属細菌を捕獲した後に該細菌を洗浄する工程を含有することを特徴とするラクトバチルス属細菌の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属細菌の検出方法に関し、更に詳細にはPCR法を用いた迅速かつ高感度な火落菌等のラクトバチルス属細菌の検出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】清酒の火落ちを起こす微生物（火落菌）に関する研究は、北原や野白、百瀬によって分類学的研究が行われている〔日本醸造協会雑誌、第65巻、第715～803頁、(1970)〕。火落菌はラクトバチルス属に属し、メバロン酸の要求性から真性火落菌と火落性乳酸菌に分類される。真性火落菌には、ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (*Lactobacillus heterohiochii*) とラクトバチルス ホモヒオチイ (*Lactobacillus homiochii*) があり、火落性乳酸菌には、ラクトバチルス ジャポニカス (*Lactobacillus japonicus*)、ラクトバチルス プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*) 等が挙げられる。火落菌の検出は、火落菌検出培地S I培地（日本醸造協会）が市販されており、本培地を用いた培養法により検出が行われている。しかし、この検出法には7日間以上の日数を要する。したがって、火落菌の迅速高感度検出法が望まれている。一方微生物やウイルスの迅速高感度検出法としてPCR法〔メソッズ インエザイモロジー (Methods in Enzymology)、第155巻、第335～350頁 (1987)〕がある。PCR法は、検出する生物の遺伝子の特異的な塩基配列を指数的に増幅させる方法であり、PCR法を用いるには検出する生物の遺伝子情報が必要である。

【0003】ラクトバチルス属細菌のrRNA遺伝子については、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス デルブルエキイ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス プランタルム、及びラクトバチルス ビリデセンス (*Lactobacillus viridescens*) の5SrRNA遺伝子の塩基配列が明らかにされており〔ジャーナル オブ モレキュラー エボリューション (Journal of Molecular Evolution)、第8巻、第143～153頁 (1976)、ヌクレック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Research)、第17巻、第4873頁 (1989)、同第16巻、第10938頁 (1988)、同第8巻、第979～987頁 (1980)〕、ラクトバチルス カゼイ、ラクトバチ

ルス カンドレリ (*Lactobacillus kandleri*)、ラクトバチルス マイナー (*Lactobacillus minor*)、ラクトバチルス コンフサス (*Lactobacillus confusus*)、ラクトバチルス ビリデセンス、ラクトバチルス カテナホルメ (*Lactobacillus cateniforme*)、及びラクトバチルス ビツリナス (*Lactobacillus vitulinus*) の16SrRNA遺伝子の塩基配列が明らかにされている〔ジャーナル オブ バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)、第171巻、第6455～6467頁 (1989)、ヌクレック アシックス リサーチ 第18巻、第3401～3402頁 (1990)、システムアティック アンド アプライド ミクロバイオロジー (Systematic and Applied Microbiology)、第12巻、第145～149頁 (1989)〕。そして土屋らはラクトバチルス ブレビスの5SrRNA遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを作製し、PCR法を用いたビール中のラクトバチルス ブレビスの検出方法を報告している〔日本醸造協会雑誌、第86巻、第720頁 (1991)〕。しかし、5SrRNAの塩基配列は微生物の属を越えて極めて類似しているため、ラクトバチルス ブレビス以外の微生物をも誤って検出してしまう可能性がある。また、16SrRNAについても同様に、微生物の属を越えて極めて類似しているため、ラクトバチルス属細菌を特異的に検出する目的には不適当である。

【0004】一方、16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子は、微生物種に特異的な塩基配列を有することが知られている。本発明者らは特願平4-113154号明細書中で各種のラクトバチルス属細菌のスペーサー領域の塩基配列を決定し、該スペーサー領域をプライマーを用いて増幅することによってラクトバチルス属細菌を検出する方法を開示している。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ラクトバチルス属細菌に特異的な遺伝子を用いてラクトバチルス属細菌、特に火落菌をPCR法で検出する方法において、更に迅速かつ高感度な検出方法を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明はラクトバチルス属細菌の検出方法に関する発明であって、プライマーを用いてラクトバチルス属細菌の核酸を増幅することによって液体試料中のラクトバチルス属細菌を検出する方法において、該液体試料をフィルターに通してラクトバチルス属細菌を捕獲した後に該細菌を洗浄する工程を含有することを特徴とする。

【0007】ラクトバチルス（以下、L. と略称する）属細菌のrRNAをコードするDNAは、16SrRNA—スペーサー領域—23SrRNA—スペーサー領域—5SrRNAの各DNA配列で構成されている。本発

明者らは特願平4-113154号明細書に記載のごとく、下記表1に示した13種類のL. 属細菌のrRNAをコードしているDNA配列の一部、すなわち16SrRNA-スパーサー領域-23SrRNAをコードしているDNA配列の一部を明らかにし、次にL. 属細菌一 \*

表

1

## (真性火落菌)

L. ヘテロヒオチイ

L. ホモヒオチイ

## (火落性乳酸菌)

L. ジャポニカス

L. プランタルム

L. カゼイ サブスピーシーズ

ラムノサス (rhamnosus)

L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ

L. スピーシーズ

## (一般乳酸菌)

L. プレピス

## (火落菌単離株)

## 【0009】培地組成:

SI: SI培地(日本醸造協会) 5g、エタノール10ml、蒸留水90ml

803: 0.5%ポリペプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%グルコース、0.2%ラクトース、0.05%ツィーン(Tween) 80、0.1%MgSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O、pH6.8~7.0

804: 0.5%ペプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%グルコース、0.1%MgSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O、pH6.6~7.0

【0010】更に、遺伝子検出方法として現在最も高感度で簡便なPCR法を行うために、L. 属細菌に共通なDNA配列及び種に特異的なDNA配列の特定領域DNAをPCR法で増幅するためのオリゴヌクレオチドプラ ※

表

2

R16-1の配列: 5'-C T T G T A C A C A C C G C C C G T C A-3'

L. カゼイ	-----
パチルス ズブチリス	-----
(Bacillus subtilis)	
エシェリヒア コリ	-----
(Escherichia coli)	
マイコバクテリウム ボビス	-----
(Mycobacterium bovis)	
ハロバクテリウム ハロビウム	----- C -----
(Halobacterium halobium)	
マイコプラズマ カプリコラ	-----50-----

\* 般に共通なDNA配列及びそれぞれの種に特異的なDNA配列を見出している。

【0008】

【表1】

菌 株 培地 培養温度

IF013118	SI	30℃
IF013119	SI	30℃
JCM1198	SI	30℃
IF013120	SI	30℃
IF013121	SI	30℃
JCM1199	SI	30℃

IAM10068	803	37℃
IAM1216	803	37℃
IF03532	804	37℃
IF03533	804	37℃
IF03954	804	37℃

IF013110	804	30℃
F-1	SI	30℃

※イマーを合成している。本発明者らは更に研究を進め、

L. 属細菌を含有する液体試料中のL. 属細菌DNAを鋳型としてPCRを行い、PCRの前処理としてL. 属細菌をフィルターに捕獲し、次に該細菌を洗浄することにより液体試料中のPCR阻害物質が除去され、L. 属細菌DNAの特定領域が効率よく増幅、検出されることを見出し本発明を完成した。

【0011】以下、具体的に本発明を説明する。16SrRNA及び23SrRNAをコードする遺伝子は微生物間でよく保存されていることが知られている(表2~表5)。

【0012】

【表2】

ム(Mycoplasma capricolum)	
シュードモナス アエルギノ	-----
サ(Pseudomonas aeruginosa)	
サーマス サーモフィラス	-----
(Thermus thermophilus)	
ハロコッカス モールアエ	----- C -----
(Halococcus morrhuae)	
ストレプトミセス リビダン	-----
ス(Streptomyces lividans)	
ヘリオバクテリウム クロラ	-----
ム(Heliobacterium chlorum)	
フラボバクテリウム ヘパリ	-----
ナム(Flavobacterium	
heparinum)	

【0013】

【表3】

表 3

R16-2の配列: 5'-G T G C G G C T G G A T C A C C T C C T-3'

L. カゼイ	N N N N N N N N N -----
バチルス ズブチリス	-----
エシェリヒア コリ	C ----- T -----
マイコバクテリウム ボビス	-----
ハロバクテリウム ハロビ	C -----
ウム	
マイコプラズマ カプリコ	----- A -----
ラム	
シュードモナス アエルギ	C -----
ノサ	
サーマス サーモフィラス	-----
ハロコッカス モールアエ	C -----
ストレプトミセス リビダ	-----
ンス	
ヘリオバクテリウム クロ	-----
ラム	
フラボバクテリウム ヘパリ	- N N N N N N N N -----
ナム	

【0014】

【表4】

## 表 4

R23-1Rの配列: 3'-C  $\begin{smallmatrix} C \\ T \end{smallmatrix}$  T A C  $\begin{smallmatrix} G \\ C \end{smallmatrix}$  G A A C C G T G A T C C T C-5'

R23-1Rの相補配列: 5'-G  $\begin{smallmatrix} G \\ A \end{smallmatrix}$  A T G  $\begin{smallmatrix} C \\ G \end{smallmatrix}$  C T T G G C A C T A G G A G-3'

バチルス ズブチリス	- G - - - C - - - - - - - - - - - - - - -
エシェリヒア コリ	- G - - - C - C - - - - - G - C A - - -
マイコバクテリウム ボビス	- G - - - C - - - - - - - T C G A - - -
ハロバクテリウム ハロビウム	- G - - A G - - C - - - T - G G A T G C
マイコプラズマ カプリコラム	- A - - - C - - - - - A - A A T - - - -
シュールドモナス アエルギノサ	- G - - - C - - - - - - - G - C A - - -
サーマス サーモフィラス	- G - - - C - - C - - - - - C C * - - -
ハロコッカス モールアエ	- A - - A G - - - - - - - G - C A - - -

【0015】

【表5】

## 表 5

R23-2Rの配列: 3'-C T T T G T A G A T T C A T G G G C C T-5'

R23-2Rの相補配列: 5'-G A A A C A T C T A A G T A C C C G G A-3'

バチルス ズブチリス	- - - - - - - - - - - - - - -
エシェリヒア コリ	- - - - - - - - - - - - - C - -
ハロバクテリウム ハロビウム	- - - G - - - - - C - - - - - G G C C -
シュールドモナス アエルギノサ	- - - - - - - - - - - - - T - -
サーマス サーモフィラス	- - - - - - - - - - - C - - - - - A - -
ハロコッカス モールアエ	- - - - - - - - - - - C - - - - - G - C -

【0016】上記表2～表5は原核生物rRNA遺伝子の保存されている塩基配列、及びそれらから選定したプライマーの塩基配列を示すものであり、表2及び表3は16SrRNA遺伝子の、表4及び表5は23SrRNA遺伝子の、それぞれ保存されている塩基配列、及びそれらから選定したプライマーの塩基配列を表す。表2～表5ではいずれも、保存されている塩基をーで、異なる塩基をその塩基の記号で、欠損している塩基を\*で、特定されていない塩基をNで示した。

【0017】例えば、配列表の配列番号1で表されるR16-1プライマーと配列番号4で表されるR23-2Rプライマーの組合せ、配列番号2で表されるR16-2プライマーと配列番号3で表されるR23-1Rの組合せでL. 属細菌のスペーサー領域をPCR法で増幅することができる。

【0018】これらのプライマーはDNA合成機により合成することができ、HPLC等で適宜精製して使用する \* 50

ることができる。

【0019】PCR法については、タックDNAポリメラーゼを含む遺伝子増幅キット及び自動遺伝子増幅装置が宝酒造社から市販されている。PCR法により増幅されたスペーサー領域を含む断片を含む塩基配列を決定するためには、例えば増幅断片をM13ファージベクターにクローニングし、ファージDNAを調製した後、サンガー法により決定することができる。

【0020】このようにして決定したスペーサー領域の塩基配列より、L. 属細菌のそれぞれの特異的な領域、あるいは共通する領域を特定することができる。本発明者らは、前記明細書において13種類のL. 属細菌のスペーサー領域の塩基配列を明らかにし、配列表の配列番号5～13に示されるL. 属細菌に特異的な塩基配列を決定している。配列表の配列番号5はL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199、配列番号6はL. ヘテロヒオチイ IFO1311

8、L. ヘテロヒオチイ IFO13119、L. ホモヒオチイ IFO13120、及びL. ホモヒオチイ IFO13121、配列番号7はL. ジャポニカス IAM10068、配列番号8はL. ブランタルム IAM1216、配列番号9はL. カゼイサブスピーシーズラムノサス IFO3532、配列番号10はL. カゼイサブスピーシーズカゼイ IFO3533、配列番号11はL. スピーシーズIFO3954、配列番号12はL. プレビス IFO13110、配列番号13は清酒より新たに分離した火落菌分離株F-1のrRNAをコードしている遺伝子の塩基配列である。

【0021】得られた塩基配列を基にそれぞれのL. 属 \*

表

\* 細菌の特異的な配列及び共通する配列を特定することができる。その結果、配列表の配列番号14～21に示される特異的な配列及び共通配列が得られる。これらの配列をPCR法のプライマーとして用いれば、それぞれのL. 属細菌DNAを特異的に増幅することができる。あるいは一対の共通プライマーですべてのL. 属細菌DNAを増幅することができる。表6にそれぞれの菌株とスペーサー領域を含む特異的な配列、特異的なプライマーの関係を示した。

【0022】

【表6】

6

菌 株	特異的な配列	特異的なプライマー
L. ヘテロヒオチイ IFO13118	配列番号 6	LAM3R (配列番号15)
IFO13119	" 6	LAM3R ( " 15)
JCM1198	" 5	LAK4R ( " 14)
L. ホモヒオチイ IFO13120	" 6	LAM3R ( " 15)
IFO13121	" 6	LAM3R ( " 15)
JCM1199	" 5	LAK4R ( " 14)
L. ジャポニカス IAM10068	" 7	LAJ3R ( " 16)
L. ブランタルム IAM1216	" 8	LAJ3R ( " 16)
L. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IFO3532	" 9	LAC4R ( " 17)
L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IFO3533	" 10	LAC4R ( " 17)
L. スピーシーズ IFO3954	" 11	LAB4R ( " 18)
L. プレビス IFO13110	" 12	LAB4R ( " 18)
火落菌単離株 F-1	" 13	LAF 1 ( " 19)

【0023】具体的に説明すれば、配列表の配列番号20で表されるLAU1と配列番号14で表されるLAK4Rのプライマー対によりL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199の遺伝子が、LAU1と配列番号15で表されるLAM3Rのプライマー対によりL. ヘテロヒオチイ IFO13118、13119とL. ホモヒオチイ IFO13120、13121の遺伝子が、LAU1と配列番号16で表されるLAJ3Rのプライマー対によりL. ジャポニカス IAM10068とL. ブランタルム IAM1216の遺伝子が、LAU1と配列番号17で表されるLAC4Rのプライマー対によりL. カゼイサブスピーシーズラムノサス IFO3532とL. カゼイサブスピーシーズカゼイ IFO3533の遺伝子が、LAU1と配列番号18で表されるLAB4Rのプライマー対によりL. スピーシーズ IFO3954とL. プレビス IFO13110の遺伝子が、配列番号19で表されるLAF1と配列番号21で表されるLA

※U3Rのプライマー対により単離株F-1の遺伝子が特異的に増幅され、各菌を特異的に検出することができる。また、LAU1とLAU3Rのプライマー対によりこれらすべてのL. 属細菌の遺伝子が増幅され、これらの菌を検出することができる。なお、L. 属細菌においてはスペーサー領域にtRNAをコードする領域が挿入されている場合があるが、この場合でもこれらのプライマーを用いて増幅、検出できる。

【0024】増幅後のL. 属細菌DNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、スポット法、及びサザンブロット法を用いて行うことができる。なお、スポット法、サザンブロット法の際は増幅領域内でプローブDNAを選択すればよい。

【0025】核酸の増幅方法、例えばPCR法のための前処理は次に例示する方法で行うことができる。

(1) 液体試料をメンブランフィルターでろ過し、L. 属細菌を捕獲する。

(2) 捕獲したL. 属細菌を必要に応じて培養する。

(3) 工程(2)を行った場合には該培養液をメンブランフィルターに通し、増殖したL. 属細菌を再び捕獲する。

(4) 工程(1)又は(3)で捕獲したL. 属細菌を洗浄する。

(5) プロティナーゼKで処理後99℃で処理し、PCRに供する。

【0026】本発明における液体試料とは例えばL. 属細菌を含む酒類、例えば清酒、みりん、ワイン等であり、また、L. 属細菌を含む培地等である。

【0027】工程(1)で使用するメンブランフィルターとしては、L. 属細菌を捕獲できるものであれば何でもよい。メンブランフィルターの材質としては例えばポリフッ化ビニリデン、ニトロセルロース、親水性ポリエーテルスルホンが挙げられるが、ポリフッ化ビニリデンが好適である。メンブランフィルターの孔径はL. 属細菌を捕獲できるものであればよく、具体的には0.1~0.8μm程度である。メンブランフィルターの直径は特に限定されないが、例えば試料300mlを用いる場合は13~47mm程度のものを使用すればよく、ろ過時間の点から47mmが好適であるが、13mm及び25mmのメンブランフィルターを用いると工程(2)において、該メンブランフィルターを1.5ml容のマイクロチューブに直接納めることができて便利であり、通常、25mmのものが使用される。

【0028】工程(2)は液体試料中のL. 属細菌の数を増加させるため、あるいは生菌と死菌を区別するために行うものである。工程(2)で使用する培地としてはSI培地が代表的であるが、アルコール濃度15%の純米酒1リットル中に酵母エキス10gとシステイン50mgを含み、pHは4.2~4.5に調整した培地(以下、改良培地と称す)を用いるとL. 属細菌の生育が早い上、核酸の増幅反応例えばPCRの反応阻害も低く、好適である。

【0029】工程(3)で使用するメンブランフィルターとしては工程(1)と同様のものが使用可能であるが、フィルター付遠心チューブを用いればそのまま遠心することにより簡便に濃縮することができる。

【0030】工程(4)の洗浄は例えば工程(1)又は \*

\* (3)を行った後、そのままメンブランフィルター上で行うことができる。すなわち、適量の洗浄液を工程

(1)又は(3)後のメンブランフィルターに直接添加し、次に遠心して濃縮すればよい。工程(4)で使用する洗浄液としては、L. 属細菌に付着した、核酸の増幅反応、例えばPCR法の阻害物質を除去できるものであればよく、滅菌水のほか、各種の緩衝液、例えばTE緩衝液(10mMトリス-HCl pH7.5、0.1mMEDTA)が挙げられる。

10 【0031】なお、工程(2)及び(3)は必要に応じて行えばよく、省略してもよい。省略する場合、工程(4)は上記の方法によるほか、例えば以下のように行うことができる。すなわち、L. 属細菌を捕獲している工程(1)のメンブランフィルターをマイクロチューブ内で滅菌水に浸して、かくはんしてL. 属細菌を懸濁、洗浄し、次にそのL. 属細菌を含む滅菌水を再びメンブランフィルター、例えばフィルター付遠心チューブに通して、L. 属細菌を捕獲して、工程(5)に供すればよい。

20 【0032】また、PCRを行う際にdUTPとウラシル-N-グリコシラーゼ(UNG)を系に加えることにより、非特異的増幅を抑えることができ、更に精度の高い検出を行うことができる。

【0033】本発明者らは上記(1)~(5)の前処理を行い、清酒試料中のL. 属細菌をPCRにて検出した。その結果、試料300ml中に1個のL. 属細菌を含むサンプルでも再現性よく検出できた。一方、(4)の洗浄工程を省略した前処理では試料300ml中に100個のL. 属細菌を含むサンプルでも検出不可能であった。

30 【0034】また、本発明者らは更に精度の高い検出のために、各L. 属細菌のスペーサー領域から配列表の配列番号22~24にそれぞれ示される各L. 属細菌のスペーサー領域に特異的なプライマー、LA1198、LAF3R、LAC3Rを作成した。各L. 属細菌の分類と各プライマー及び前出のLAM3R(配列番号15)の対応を表7に示す。

【0035】

【表7】



表 7

分 類	菌 名	プ ラ イ マ ー
真性火落菌	L. ヘテロヒオチイ JCM 1198	LA1198 (配列番号22)
	火落菌分離株P-a	
	L. ホモヒオチイ IF0 13120	LAM3R (配列番号15)
火落性乳酸菌	火落菌分離株F-1	LAF3R (配列番号23)
	L. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IF0 3532	LAC3R (配列番号24)
	L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IF0 3533	

【0036】具体的に説明すれば、配列表の配列番号20で表されるLAU1と配列番号22で示されるLA1198のプライマー対で真性火落菌、例えばL. ヘテロヒオチイ JCM1198型と火落菌分離株P-a型の遺伝子が、LAUAとLAM3Rのプライマー対で真性火落菌、例えばL. ホモヒオチイ IF013120型の遺伝子が、LAU1と配列表の配列番号23で示されるLAF3Rのプライマー対で、火落性乳酸菌、例えば火落菌分離株F-1型の遺伝子が、LAU1と配列表の配列番号24で示されるLAC3Rのプライマー対で火落性乳酸菌、例えばL. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IF03532型とL. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IF03533型の遺伝子が増幅される。

【0037】これらのプライマーは各火落菌のスペーサー領域の遺伝子の塩基配列と一致するため、ユニバーサルプライマーであるLAU3Rよりも更に感度、精度の高い検出が可能である。また、LA1198、LAM3R、LAF3R、及びLAC3Rの4種のプライマーを混合して用いることによりすべての型の火落菌を検出することができる。

【0038】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

表

\* 【0039】実施例1

20 (1) フィルターの検討

清酒より分離されたL. 属細菌(伏見1-6株)をエタノール10%を含むSI液体培地10mlで30℃、24時間培養した。この培養液中の菌体の数を血球計算盤にて計数後、15%エタノールで希釈し、それぞれ100個/20ml、10個/20mlの溶液を4本ずつ調製し試料とした。フィルターとしてミリポア社のMF-ミリポアメンブランフィルター(セルロース混合エステル製、孔径0.45μm、直径25mm)、ミリポア社のデュラポアメンブランフィルター(ポリフッ化ビニリデン製、孔径0.45μm、直径25mm)、ゲルマンサイエンス社のスーポアメンブランフィルター(親水性ポリスルホン製、孔径0.45μm及び0.2μmの2種類、いずれも直径25mm)の4種類を選択、検討した。各試料をそれぞれのフィルターでろ過後、該フィルターを1.5ml容マイクロチューブ内で0.4mlの改良培地に浸し、10秒間かくはんした。次に、該改良培地全量を1%アガーを含むSI培地(エタノール10%)上にプレーティング後、該SI培地を重層し、更に1%アガーを重層し、30℃で4日間培養し、コロニーの数を調べた。表8に各試料のコロニー数を示す。

【0040】

【表8】

メンブランフィルター	8	
	100個/20ml	10個/20ml
MFミリポアメンブランフィルター	23	1
デュラポアメンブランフィルター	197	26
スーポアメンブランフィルター (孔径0.45μm)	14	4
スーポアメンブランフィルター	50	21
		1

【0041】すなわち、デュラポアメンブランフィルターが菌体の捕獲効率が優れており、L. 属細菌の検出に適していた。

【0042】(2) 清酒、SI 培地、改良培地によるPCR反応阻害

試料として、15%アルコール濃度の吟醸生酒、10%エタノールを含むSI 培地、10%の本醸造酒を含む改良培地を用いた。鋳型としてL. カゼイのゲノムDNA (最終濃度 2ng/100  $\mu$ l)、プライマーとしてLAU1とLAU3R (最終濃度 0.2  $\mu$ M) を使用し、各試料を適量すなわち、

吟醸生酒の場合 0、5  $\mu$ l、10  $\mu$ l、20  $\mu$ l、30  $\mu$ l、50  $\mu$ l/100  $\mu$ l

SI 培地の場合 0、0.5  $\mu$ l、1  $\mu$ l、2  $\mu$ l、5  $\mu$ l、10  $\mu$ l/100  $\mu$ l

改良培地の場合 0、5  $\mu$ l、10  $\mu$ l、20  $\mu$ l、30  $\mu$ l、50  $\mu$ l/100  $\mu$ l

を含む100  $\mu$ lのPCR反応溶液〔10mM トリス-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン、2.5ユニット/100  $\mu$ l タックポリメラーゼ〕を調製した。各溶液にミネラルオイル (シグマ社) 100  $\mu$ l を重層し、94℃0.5分、55℃1分、72℃1分、30サイクルの条件でDNAサーマルサイクラー (宝酒造社) を用いてPCRを行った。反応終了後、10  $\mu$ l分をヌシーブ (Nusieve) 3:1アガロース (FMC社) ゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色して増幅されたDNAを観察した。その結果、吟醸生酒で20  $\mu$ l以上、SI 培地で1  $\mu$ l以上、改良培地で50  $\mu$ l以上の添加でPCRの反応阻害が見られた。すなわち、PCRの前段階で用いる培地としてはSI 培地よりも改良培地の方が優れていることが明らかになった。

【0043】(3) 液体試料中のL. 属細菌の検出

伏見1-6株を10%エタノールを含むSI 液体培地15mlで30℃、2日間培養した。この培養液中の菌体数を血球計算盤にて計数後、10%アルコール濃度の純米酒で希釈し、300  $\mu$ l中に0、0.1、1、10、100個の菌数になるよう各サンプルを調製した。次に、各サンプル300  $\mu$ lを、直径25mm、孔径0.45  $\mu$ mのデュラポアメンブランフィルターを用いて吸引ろ過して菌体をフィルター上に捕獲した。次に、該フィルターを1.5ml容マイクロチューブ内で0.4mlの改良培地に浸し、30秒間かくはんした後そのまま30℃で24時間培養した。次に、該培養液をフィルター付遠心チューブ スプレック (SUPREC) -01 (宝酒造社) に移し、5000rpmで1分間遠心し、増幅した菌体をフィルター上に捕獲した。

【0044】次に、0.4mlの滅菌蒸留水をスプレック \*50

\*-01のフィルター上に添加し、5000rpmで1分間遠心し、菌体を洗浄した。次に、スプレック-01のフィルター上に0.1mg/mlプロティナーゼKを含むPCR用緩衝液〔10mM トリス-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン〕78.5  $\mu$ lを加えて懸濁後0.5ml容のマイクロチューブに移し、ミネラルオイル60  $\mu$ lを重層後、65℃で60分間処理し、更に99℃で10分間処理して、菌体を破壊し、DNAを露出させた。一方、比較対照として0.4mlの滅菌蒸留水で洗浄する工程を省略するサンプルも同時に調製した。

【0045】次に、各サンプルに21.5  $\mu$ lのPCR反応液〔50mM トリス-HCl pH8.3、250mM KCl、7.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.005% (W/V) ゼラチン、1mM dUTP、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、1  $\mu$ M LAU-1プライマー、1  $\mu$ M プライマー、0.125U/ $\mu$ lアンプリタック (Ampri Taq)、0.005U/ $\mu$ l UNG)を加えDNAサーマルサイクラーにてPCRを行った。プライマーとしては配列表の配列番号24で示されるLAC3Rを新たに作成して使用した。PCRの条件は、45℃で10分、95℃で10分を1サイクル、更に94℃で0.5分、55℃で1分、72℃で1分のサイクルを40サイクル行った。反応後、反応液の10  $\mu$ lをヌシーブ3:1アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して増幅されたDNAを検出した。その結果、洗浄工程を入れた場合は300ml中に1、10、100個のL. 属細菌を含む各サンプルで約170bpの増幅産物が認められ、L. 属細菌を検出することができた。一方、洗浄工程を省略した対照はいずれのサンプルでも増幅産物が認められず、L. 属細菌を検出できなかった。また、別のL. 属細菌N5株についても全く同様の結果であった。

【0046】(4) 新しいプライマーを用いた火落菌検出

更に高感度で高精度な火落菌検出を目的として表7に示すLA1198 (配列番号22)、LAF3R (配列番号23)、の各プライマーを作成した。次に表7に示すそれぞれの火落菌について、対応するプライマーとLAU-1のプライマー対で各火落菌のゲノムDNA 1ngを鋳型としてPCRを行った結果、すべての火落菌でLAU-1とLAU3Rのプライマー対の場合よりも効率よく増幅された。また、それぞれの火落菌について、これらのプライマーとLAU-1のプライマー対で実施例1-(3)と同様にして液体試料中の火落菌を検出した結果、いずれも300ml中に1個の火落菌でも検出することができた。更に、LA1198、LAM3R、LAF3R、LAC3Rの4種のプライマーを混合したものを

用いた場合も、同様に各火落菌を効率よく検出することができた。

【0047】

【発明の効果】本発明により、L. 属細菌、特に火落菌の迅速かつ高感度な検出方法が提供された。

【0048】

【配列表】

【0049】配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA 20

【0050】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

GTGCGGCTGG ATCACCTCCT 20

【0051】配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCATGATA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTTAGGTAAC 60  
TTTTGGAGCC TGCCGCCTAA GGTGGGACAG ATGATTAGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAGC 120  
CGTAGGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA AAAATTGCGA AACCTACAC 180  
AATTAAAGTC TTGTTTAGTT TTGAGAGTTT TACTCTCAAT ACTTTGTCTT TTGAAACTA 240  
GATAATATTA TTTTCTGTAT TAATTATATT TTAATTATAA TTTTAACCGA GAAATAACCA 300  
CTACGTTATT TGAGTTTTTT AAAATAGTTT AAATCGCAAA TACTCAATAA CTTACATCAC 360  
GAAGTGATGC AGGTAAAGTT ATTAAGGGCG CATGGTGAAT GCCTTGGTAC TAGGAGCCGA 420  
TGAAGGACGG AACTAACACC GATATGTTTC GGGGAGCTGT ACGTAAGCTT TGATCCGGAG 480  
ATTTCGGAAT GGGGAAACCC AATCATCTTA GTCGATGATT GCTCGACAGT GAATTCACCTG 540

【0054】配列番号：6

配列の長さ：585

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (Lactobacillus heterohiochii)

\* アンチセンス：YES

配列：

CTCCTAGTGC CAAGSCATYC 20

【0052】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

10 アンチセンス：YES

配列：

TCCGGTACT TAGATGTTTC 20

【0053】配列番号：5

配列の長さ：540

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

20 生物名：ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (Lactobacillus heterohiochii)

株名：JCM 1198

生物名：ラクトバチルス ホモヒオチイ (Lactobacillus homohiochii)

株名：JCM1199

配列の特徴：

1-155 16SrRNA をコードする領域

156-371 スペーサー領域

220 tRNAをコードする領域の挿入位置

30 372-540 23SrRNA をコードする領域

\*

※株名：IF013118, IF013119

生物名：ラクトバチルス ホモヒオチイ (Lactobacillus homohiochii)

株名：IF013120, IF013121

配列の特徴：

1-162 16SrRNA をコードする領域

163-370 スペーサー領域

277 tRNAをコードする領域の挿入位置

※50 371-585 23SrRNA をコードする領域

19

20

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GCCGGATAAC 60  
 CTAGTTTACT AGGAGTCAGC CGTCTAAGGT GGGACAAATG ATTAGGGTGA AGTCGTAACA 120  
 AGGTAGCCGT AGGAGAACCT GCGGCTGGAT CACCTCCTTT CTAAGGAAAA AAAGCGAAGC 180  
 TGACGGAGAG TAGGAGACTA CTAAGAGAAG TCAGTGAAGC AAACGGAAGC ACACGAAAGA 240  
 GACTTTGTTT AGTTTIGAGG GTAGTACCTC AAGAAAAGTT AGTACATTGA AACTGAATA 300  
 TAATCCAAT AAAAACCGAG ACAATCATTG AAGAACAGAT TGTAGAGCGA CCGAGAAGAG 360  
 CGATCTTAAA GTAAGGTCAA GTAGACAAGG GCGCACGGTG AATGCCTAGG CACTAGCAGC 420  
 CGAAGAAGGA CGTGACGAAC TACGAAAAGC TTCGGGGAGT TGTAAGTAAA CTAAGATCCG 480  
 GAGATGTCCA AATGGGGAAA CCAATGCAG TGATGCATTA TTAGTAGCCG AATAGATAGG 540  
 CTGGTAAAGG AAGACGCAGT GAACTGAAAC ATCTAAGTAC CCGGA 585

【0055】配列番号：7

\* s japonicus)

配列の長さ：574

株名：IAM10688

配列の型：核酸

配列の特徴：

鎖の数：二本鎖

1-155 16SrRNA をコードする領域

トポロジー：直鎖状

156-358 スペーサー領域

配列の種類：genomic DNA

224 tRNAをコードする領域の挿入位置

起源：

359-574 23SrRNA をコードする領域

生物名：ラクトバチルス ジャポニカス (Lactobacillus \*)

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC 60  
 TTTTAGGAAC CAGCCGCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAGGTAG 120  
 CCGTAGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA ATATTACGGA AACCTACACA 180  
 CGCGTCGAAA CTTTGTTTAG TTTTGAGAGA TTTAACTCTC AAAACTTGTT CTTTGAAAAC 240  
 TAGATAATAT CAAATATATT TTTTCATAAT GAAACCGAGA ACACCGCGTT TTTTGAGTTT 300  
 TTTATTGAAG TTTAATTATC GCTAACTCA TTAATCGCAT TTACCGTTAG GTAAATGAGG 360  
 TTAAGTTAAC AAGGGCGCAT GGTGAATGCC TTGGCACTAG GAGCCGATGA AGGACGGGAC 420  
 TAACACCGAT ATGCTTCGGG GAGCTGTACG TAAGCTATGA TCCGGAGATT TCCGAATGGG 480  
 GCAACCCAGC AGTTTAAATC AACTGTTACC ACTAGATGAA TTCATAGTCT AGTTGGAGGT 540  
 AAACGCTGTG AACTGAAACA TCTAAGTACC CGGA 574

【0056】配列番号：8

※ s plantarum)

配列の長さ：574

株名：IAM1216

配列の型：核酸

配列の特徴：

鎖の数：二本鎖

1-155 16SrRNA をコードする領域

トポロジー：直鎖状

156-358 スペーサー領域

配列の種類：genomic DNA

224 tRNAをコードする領域の挿入位置

起源：

359-574 23SrRNA をコードする領域

生物名：ラクトバチルス プランタルム (Lactobacillus ※)

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGGTAAC 60  
 TTTTAGGAAC CAGCCGCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAGGTAG 120  
 CCGTAGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA ATATTACGGA AACCTACACA 180  
 CGCGTCGAAA CTTTGTTTCA TTTTGAGAGA TTTAACTCTC AAAACTTGTT CTTTGAAAAC 240  
 TAGATAATAT CAAATATATT TTTTCATAAT GAAACCGAGA ACACCGCGTT TTTTGAGTTT 300  
 TTTATTGAAG TTTAATTATC GCTAACTCA TTAATCGCAT TTACCGTTAG GTAAATGAGG 360  
 TTAAGTTAAC AAGGGCGCAT GGTGAATGCC TTGGCACTAG GAGCCGATGA AGGACGGGAC 420  
 TAACACCGAT ATGCTTCGGG GAGCTGTACG TAAGCTATGA TCCGGAGATT TCCGAATGGG 480  
 GCAACCCAGC AGTTTAAATC AACTGTTACC ACTAGATGAA TTCATAGTCT AGTTGGAGGT 540  
 AAACGCTGTG AACTGAAACA TCTAAGTACC CGGA 574

【0057】配列番号：9

★50★配列の長さ：588

21

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス カゼイ サブスピーシーズ  
カゼイ

配列：

```

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCGAAGCCG GTGGCGTAAC 60
CTTTTAGGGA GCGAGCCGTC TAAGGTGGGA CAAATGATTA GGTGAAGTC GTAACAAGGT 120
AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTTCTAA GGAAACAGAC TGAAAGTCTG 180
ACGGAACCT GCACACACGA AACTTTGTTT AGTTTGGAG GGATCACCCCT CAAGCACCCCT 240
AACGGGTGCG ACTTTGTTCT TTGAAACTG GATATCATTG TATTAATTGT TTAAATTGC 300
CGAGAACACA GCGTATTGTG ATGAGTTTCT GAAAAAGAAA TTCGCATCGC ATAACCGCTG 360
ACGCAAGTCA GTACAGGTTA AGTTACAAAG GCGCACGGT GGATGCCTTG GCACTAGGAG 420
CCGATGAAGG ACGGAATAA TACCGATATG CTTCGGGGAG CTATAAGTAA GCTTTGATCC 480
GGAGATTTC GAATGGGGGA ACCCAGTACA CATCAGTGTG TTGCTTGTC GTGAATACAT 540
AGCTGGCCGG CGGCAGACGC GGGGAACGA AACATCTAAG TACCCGGA 588

```

【0058】配列番号：10

配列の長さ：588

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス カゼイ サブスピーシーズ ※

配列：

```

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCGAAGCCG GTGGCGTAAC 60
CTTTTAGGGA GCGAGCCGTC TAAGGTGGGA CAAATGATTA GGTGAAGTC GTAACAAGGT 120
AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTTCTAA GGAAACAGAC TGAAAGTCTG 180
ACGGAACCT GCACACACGA AACTTTGTTT AGTTTGGAG GGATCACCCCT CAAGCACCCCT 240
AGCGGGTGCG ACTTTGTTCT TTGAAACTG GATATCATTG TATTAATTGT TTAAATTGC 300
CGAGAACACA GCGTATTGTG ATGAGTTTCT GAAAAAGAAA TTCGCATCGC ATAACCGCTG 360
ACGCAAGTCA GTACAGGTTA AGTTACAAAG GCGCACGGT GGATGCCTTG GCACTAGGAG 420
CCGATGAAGG ACGGAATAA TACCGATATG CCTCGGGAG CTATAAGTAA GCTTTGATCC 480
GGAGATTTC GAATGGGGGA ACCCAGTACA CATCAGTGTG TTGCTTGTC GTGAATACAT 540
AGCTGGCCGG CGGCAGACGC GGGGAACGA AACATCTAAG TACCCGGA 588

```

【0059】配列番号：11

配列の長さ：414

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス スピーシーズ (Lactobacillu ★

配列：

```

CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GTGAGATAAC 60
CTTCGGGAGT CAGCCGCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGTAG 120
CCGTAGGAGA ACCTGCGGCT GGATCACCTC CTTTCTAAGG AATATACGGA GGCTACACAT 180
ACTTGTGAA ACAATGTTCA GTTTTGAGGG GCTAACCTCT CTAAACTTGT TCTTTGAAAA 240

```

22

\* (Lactobacillus casei subsp. rhamnosus)

株名：IF03532

配列の特徴：

1-158 16SrRNA をコードする領域

159-375 スペーサー領域

250 tRNAをコードする領域の挿入位置

\* 376-588 23SrRNA をコードする領域

※カゼイ

20 (Lactobacillus casei subsp. casei)

株名：IF03533

配列の特徴：

1-158 16SrRNA をコードする領域

159-375 スペーサー領域

250 tRNAをコードする領域の挿入位置

376-588 23SrRNA をコードする領域

★s sp.)

株名：IF03934

40 配列の特徴：

1-156 16SrRNA をコードする領域

157-370 スペーサー領域

225 tRNAをコードする領域の挿入位置

371-414 23SrRNA をコードする領域

23

24

CTAGATATTA TCAATTATTT TCCTTTAATT ATTAAGATAA TTAAACCGAG AAACAACGTC 300  
 GTATTTTGA GTTTTAAAT TAGTTTATCG CTAATACTCA ATTAATTTGA CGATCACGAA 360  
 GTGACCGTTA GGTAAAGTTA TGAAGGGCGC ATGGTGGAGC CTTGGTACTA GGAG 414

【0060】配列番号:12

\* evis)

配列の長さ:585

株名: IF013110

配列の型: 核酸

配列の特徴:

鎖の数: 二本鎖

1-156 16SrRNA をコードする領域

トポロジー: 直鎖状

157-370 スペーサー領域

配列の種類: genomic DNA

225 tRNAをコードする領域の挿入位置

起源:

10 371-585 23SrRNA をコードする領域

生物名: ラクトバチルス プレビス (Lactobacillus br \*

配列:

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCACGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GTGAGATAAC 60  
 CTTGGGAGT CAGCCGTCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAGGTAG 120  
 CCGTAGGAGA ACCTGCGGCT GGATCACCTC CTTTCTAAGG AATATACGGA GGCTACACAT 180  
 ACTTGTGAA ACAATGTTCA GTTTTGAGGG GCTTACCTCT CTAACTTGT TCTTTGAAAA 240  
 CTAGATATTA TCAATTATTT TCCTTTAATT ATTAAGATAA TTAAACCGAG AAACAACGTC 300  
 GTATTTTGA GTTTTAAAT TAGTTTATCG CTAATACTCA ATTAATTTGA CGATCACGAA 360  
 GTGACCGTTA GGTAAAGTTA TGAAGGGCGC ATGGTGGAGC CTTGGTACT AGGAGCCGAT 420  
 GAAGGACGGG ACTAACACCG ATATGCTTCG GGGAGCTGTA CGTAAGCTTT GATCCGAGGA 480  
 TTTCCGAATG GGGAAACCCA ATCATCTTTA CCGATGATTA CAACTTGATG AATACATAGT 540  
 CAAGTTGAGG CAGACGTGGG GAACTGAAAC ATCTAAGTAC CCGGA 585

【0061】配列番号:13

※生物名: ラクトバチルス (Lactobacillus)

配列の長さ:286

株名: F-1

配列の型: 核酸

配列の特徴:

鎖の数: 二本鎖

1-20 16SrRNAをコードする領域

トポロジー: 直鎖状

21-241 スペーサー領域

配列の種類: genomic DNA

86 tRNAをコードする領域の挿入位置

起源:

※ 242-286 23SrRNA をコードする領域

配列:

GGCTGGATCA CCTCCTTCT AAGGAAAATT CGGAAACCTA CACAATGTCG AAAGTTTGT 60  
 TCAGTTTGA GAGGTCTACT CTCAAATG GTTCTTTGAA AACTAGATAA TATTAATTTT 120  
 CTGTAATTTA TTGAATTGGA TATAATCCAA TTTCAACCGA GAACACCGCG TTATTTGAG 180  
 TTTGTAACT AAGTAAAAA TCGCAAATAC TCAATTAAT AAAGTATCCG TAGGATACTT 240  
 AGGTAAAGTT ATCAAGGGCG CATGGTGAAT GCCTTGGCAC TAGGAG 286

【0062】配列番号:14

★アンチセンス: YES

配列の長さ:20

配列:

配列の型: 核酸

GCTCTACAAT CTGTTCTTCA 20

鎖の数: 一本鎖

【0064】配列番号:16

トポロジー: 直鎖状

40 配列の長さ:20

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列の型: 核酸

アンチセンス: YES

鎖の数: 一本鎖

配列:

トポロジー: 直鎖状

CCTGCATCAC TTCGTGATGT 20

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

【0063】配列番号:15

アンチセンス: YES

配列の長さ:20

配列:

配列の型: 核酸

TTTACCTAAC GGTAAATGCG 20

鎖の数: 一本鎖

【0065】配列番号:17

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ:20

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

★50 配列の型: 核酸

鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：YES  
 配列：  
 GTACTGACTT GCGTCAGCGG 20  
 【0066】配列番号：18  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：YES  
 配列：  
 GGTCACCTCG TGATCGTCAA 20  
 【0067】配列番号：19  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：NO  
 配列：  
 AATTCGAAA CCTACACAAT 20  
 【0068】配列番号：20  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：NO  
 配列：  
 ATCACCTCCT TTCTAAGGAA 20  
 【0069】配列番号：21  
 配列の長さ：20

\* 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：YES  
 配列：  
 AAAAAACGCG GTGTTCTCGG 20  
 【0070】配列番号：22  
 配列の長さ：22  
 10 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：YES  
 配列：  
 TAACGTAGTG GTTATTCTC GG 22  
 【0071】配列番号：23  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 20 鎖の数：一本鎖  
 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：YES  
 配列：  
 CAAATACGCT GTGTTCTCGG 20  
 【0072】配列番号：24  
 配列の長さ：20  
 配列の型：核酸  
 鎖の数：一本鎖  
 30 トポロジー：直鎖状  
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）  
 アンチセンス：YES  
 配列：  
 AAATAACGCG GTGTTCTCGG 20

\*

---

 フロントページの続き

(72)発明者 富士野 公也  
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造  
 株式会社中央研究所内

※

※(72)発明者 加藤 郁之進  
 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造  
 株式会社中央研究所内